

УДК 616.579+599.322

А. Р. Вардanian, Г. М. Симонян, академик К. Г. Карагезян, М. А. Симонян

Воздействие фракции с антиоксидантной активностью, полученной из белкового железа огородной улитки *Helix*, на эндогенный уровень металлопротеинов крови крыс при аллоксановом диабете

(Представлено 9/XII 2005)

Ключевые слова: *белковое железо улитки, антиоксидантная активность, аллоксановый диабет, металлопротеины*

В различных органах огородной улитки *Helix*, особенно в белковой железе, обнаружены ферменты антиоксидантной активности: СОД, каталаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-S-трансфераза, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа. Причем уровень этих антирадикальных защитных систем с повышением продуцирования активных форм кислорода (АФК) фагоцитирующими гемоцитами заметно повышается при возбуждении улиток внешними факторами [1-3]. Обогащенная антиоксидантами фракция из улитки *Helix* может быть более доступным, безвредным и эффективным средством для снижения оксидативного повреждения крови при различных патологических состояниях, включая и аллоксановый диабет, по сравнению с антиоксидантными препаратами, полученными из тканей млекопитающих [4-6].

Цель работы состоит в исследовании полученной из белкового железа огородной улитки *Helix* фракции, обогащенной антиоксидантными ферментами, как средства для регулирования эндогенного уровня и активности антиоксидантных и прооксидантных металлопротеинов крови крыс при аллоксановом диабете.

Фракцию с антиоксидантной активностью (ФАА) из белкового железа улитки *Helix* получали модифицированием биотехнологического способа для выделения и очистки металлопротеинов (МП) [7]. При этом после гомогенизации белкового железа в калий фосфатном буфере (КФБ), рН 7.4, и центрифугирования супернатант подвергали ионообменной хроматографии на целлюлозе ДЕ-52 ("Whatman"). В итоге из 25 г белкового железа получали 300 мл ФАА с СОД-активностью 3300 ед/г ткани. Это активность фермента Cu,Zn-супероксиддисмутазы (СОД), которая подавляется перекисью водорода [8]. Каталазная активность ФАА составляла 25 ед/г. Используемая активность для СОД составляла 215 ед/мл, а для каталазы - 2 ед/мл.

Аллоксановый диабет у белых крыс массой 180-220 г вызывали однократным внутрибрюшинным введением аллоксана ("Sigma") в дозе 150 мг/кг массы животного. Животные были подразделены на группы (по 12 крыс в каждой): интактные (К), 15-дневные аллоксандиабетические (опытная группа 1, ОГ-1), аллоксандиабетические с трехкратным введением (по 1 мл) ФАА через каждые 3 дня (ОГ-2), аллоксандиабетические с семикратным

введением ФАА (ОГ-3). После 12-дневного прерывания подачи ФАА животным ОГ-2 возобновили подачу ФАА еще 4 раза (ОГ- 4). Гибель животных в ОГ-1 составила 14 -15, в ОГ-2 -7-8, в ОГ-3 и ОГ- 4-0%.

МП антиоксидантной активности (МАО) и МП прооксидантной активности (МПА) получали из крови животных всех групп одновременно. МАО (Cu,Zn-СОД и каталазу - из растворимой фракции эритроцитов, церулоплазмин (ЦП) и трансферрин (ТФ) - из сыворотки крови) и МПА (цитохром b5 - из растворимой фракции эритроцитов, изоформы цитохрома b558 I-IV - из сыворотки крови и эритроцитарных мембран (ЭМ) [9], а также O_2^- -продуцирующий липопротеин [10] сыворотки - супрол) выделяли и очищали биотехнологическим способом путем ионообменной хроматографии белковых фракций сыворотки, растворимой части эритроцитов и ЭМ на целлюлозах ДЕ-52 и КМ-52, сефадексе ДЕАЕ А-50 и гель-фильтрации на сефадексе G-100 [11]. Цитохром (цит) b558III и цит b558IV выделяли и очищали без использования детергента, заметно снижающего стабильность указанных гемопротеинов [12]. Количество МП определяли путем измерения характерной для данного белка плотности максимального оптического поглощения: для цит b5 при 525 нм, для изоформ цит b558 - при 530, супрола - 430, ЦП - 610 и ТФ - 470 нм. Активность СОД и супероксид-продуцирующую активность цит b558III и супрола определяли нитротетразолиевым синим (НТС) методом [13] путем измерения процента ингибирования (для СОД) или увеличения (для супрола и цит b558III) образования формазана в результате восстановления НТС супероксидными радикалами (O_2^-). За единицу СОД-активности принимали количество фермента, снижающее продуцирование формазана (при 560 нм) на 50%. Удельную СОД-активность определяли в расчете на 1 мл эритроцитов. За единицу НАДРН-зависимой O_2^- -продуцирующей активности цит b558III и супрола [14] принимали количество белков, повышающих образование формазана на 50%. Удельная O_2^- -продуцирующая активность для цит b558III была рассчитана на 1 мл эритроцитов, а для супрола - на 1 мл сыворотки. Для определения O_2^- -продуцирующей активности цит b558III в гетерогенной фазе (в ЭМ) к реакционной смеси добавляли 0.5 мл ЭМ, смешанных с 0.04 М КФБ. Метгемоглобин (метHb)-восстанавливающую активность цит b558III [14] определяли путем измерения процента снижения плотности поглощения альфа-полосы (при 565 нм) мет Hb (ферриHb- Fe^{+3}) в течение 4-8 ч при 30°. Такое снижение плотности поглощения альфа-полосы прямо пропорционально увеличению уровня образовавшегося ферроHb (Fe^{+2} - Hb) при 555 нм. За единицу метHb-восстанавливающей активности цит b558III принимали количество гемопротеина, уменьшающее интенсивность плотности альфа-полосы до 0.05 в течение 30 мин при 30°. Удельная метHb-восстанавливающая активность цит b558III была определена в расчете на 1 мл эритроцитов. При определении метHb-восстанавливающей активности цит b558III в гомогенной фазе величина плотности поглощения изолированного цит b558III (A530) в реакционной смеси (3 мл) составляла 0.02. Расчетный уровень добавленного к реакционной смеси цит b558III в гетерогенной фазе (в 0.5 мл ЭМ) в 5-10 раз ниже по сравнению с содержанием цит b558III в гомогенной фазе. Процедура определения метHb-восстанавливающей активности такова: непосредственно в кварцевых кюветах

спектрофотометра к 2.5 мл свежеполученного метНб добавляли 0.5 мл изолированного цит b558III (гомогенная фаза) или 0.5 мл ЭМ, смешанных с 0.04 М КФБ (гетерогенная фаза). После быстрого смешивания реакционной смеси ее оставляли в покое и осторожно (без перемешивания) регистрировали снижение плотности альфа-поглощения метНб при указанных выше условиях. Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия достоверности.

У алоксандиабетических крыс на 15-й день эксперимента наблюдается повышение уровня цит b5 на фоне снижения эндогенного уровня сывороточных (цит b558I, b558II) и ЭМ цитохромов (цит b558II, цит b558IV). Увеличивается НАДРН-зависимая супероксид-продуцирующая и метНб-восстанавливающая активность цит b558III. Возрастает и супероксид-продуцирующая активность супрола. Из МАА существенно снижается уровень каталазы и ЦП (табл.1). Уровень Cu,Zn-СОД и ТФ несколько повышается. Снижение уровня каталазы может привести к повышению уровня перекиси водорода в эритроцитах. Причем перекись водорода необратимо деградирует и цит b558III ЭМ [15].

Таблица 1

Относительные изменения (%) эндогенного уровня и активности МАА и МПА в ОГ 1-4 по сравнению с 100%-ными контрольными показателями (P < 0.05, n = 8)

МП, активность	ОГ-1 *	ОГ-2 *	ОГ-3 **	ОГ-4 ***
Цит b5	+37.1 +/- 3.6	-14.3 +/- 2.2	41.2 +/- 4.0	+21.3 +/- 2.3
Цит b558 I, II	-23.4 +/- 1.9	-77.0 +/- 4.3	-43.3 +/- 2.8	-10.2 +/- 0.8
Цит 558 III	-36.5 +/- 3.1	-42.3 +/- 3.4	-16.3 +/- 1.4	+7.3 +/- 0.5
Цит 558 IV	-40.0 +/- 3.9	-28.7 +/- 2.4	-15.0 +/- 1.2	+10.2 +/- 1.1
O ₂ ⁻ продуцирующая активность цит 558III	+28.1 +/- 2.2	+35.2 +/- 2.9	+18.1 +/- 3.0	+14.0 +/- 2.1
МетНб восстанавливающая активность цит b558III	+235 +/- 1.3	+26.1 +/- 2.1	+29.3 +/- 4.0	+32.2 +/- 4.4
Супрол	+9.5 +/- 2.0	-15.8 +/- 1.7	-5.5 +/- 0.4	+2.3 +/- 0.2
O ₂ ⁻ - продуцирующая активность супрола	+60.2 +/- 4.9	-80.0 +/- 5.1	+171.0 +/- 21.4	+12.3 +/- 1.1

ЦП	-44.5+/-4.2	-41.3+/-3.5	-33.4+/-2.1	-10.1+/-1.2
ТФ	+ 4.7+/-0.2	-56.0+/-3.1	-28.6+/-3.5	+8.4+/-1.1
Cu,Zn-СОД	+10.0+/-0.3	-12.3+/-1.6	-16.6+/-2.2	+4.5+/-0.8
Каталаза	-45.7+/-2.4	-2.9+/-0.3	-19.8+/-2.0	+12.2+/-1.5

Примечание: животные были декапитированы на 15-й (*), 36-й (**) и 60-й день (***) эксперимента

Фактически этот эффект наблюдается и при аллоксановом диабете в описанном режиме. Расчетный суммарный уровень МАА (антиоксидантный статус - АС) и МПА (прооксидантный статус - ПС) сыворотки крови и эритроцитов изменяется почти адекватно. Исключение составляет ПС сыворотки крови, который существенно повышается (табл.2). Фактически метаболизм АФК в крови существенно различается на 7- и 15-й день аллоксанового диабета [16], при этом дельта-содиндуцирующий пептид оказывает определенное положительное воздействие на процессы регулирования эндогенного уровня МАА и МПА, а также глюкозы в крови животных [17]. В ОГ-2 трехкратное введение ФАА крысам приводит к существенному снижению эндогенного уровня МАА и МПА с адекватным снижением АС и ПС сыворотки и эритроцитов (табл.1, 2). При семикратном введении ФАА (ОГ-3) наблюдается некоторое приближение рассматриваемых показателей к норме.

Таблица 2

Относительные изменения (%) АС и ПС сыворотки крови и эритроцитов в ОГ 1-4, по сравнению с 100%-ными контрольными показателями (P < 0.05, n = 8)

Компоненты крови	ОГ-1		ОГ-2		ОГ-3		ОГ-4	
	АС	ПС	АС	ПС	АС	ПС	АС	ПС
Сыворотка	-39.8	+79.7	-97.3	-95.8	-62.0	+ 165.5	-1.7	14.6+/-
	+/- 3.3	+/-4.1	+/-6.1	+/- 7.0	+/- 4.1	+/- 11.3	+/- 0.3	1.8
Эритроциты	-35.7	-33.8	-15.2	-127.1	-36.4	-15.5	+57.2	+ 42.8
	+/-2.4	+/-3.1	+/-1.4	+/-14.5	+/-4.2	+ 1.3	+/-4.6	+/-3,1

Если при семикратном введении ФАА (ОГ-3) уровень глюкозы в крови и фосфолипидного обмена в других органах имеет тенденцию к нормализации [18], то АС и ПС в основном не приближаются к норме. Картина определенно изменяется в ОГ-4, где эндогенные уровни МАА и МПА, а также АС и ПС в основном приближаются к норме. При этом остается еще повышенной метНб-восстанавливающая активность цит b558III, что также обусловлено действием адаптационных механизмов организма для улучшения кислородного гомеостаза [14]. Такой режим подачи ФАА в ОГ-4, видимо, дает организму возможность создания соответствующих адаптационных систем с новым физиологическим статусом, более

чувствительным к воздействию уже "привычных" экзогенных антиоксидантных систем, в частности ФАА, имеющей не только супероксиддисмутазную, но и каталазную активность (не исключается и положительный эффект пока не определенных компонентов в полученной фракции из белкового железа огородных улиток). В результате этого существенно ослабляется стрессорное состояние организма, что положительно влияет и на восстановление функции клеток поджелудочной железы.

Таким образом, использованная в описанном режиме ФАА оказывает положительное воздействие на регулирование эндогенных уровней МАА и МПА при аллоксан-индуцированном диабете.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана НАН РА

Литература

1. *Dikkebaum R., van der Knaap W.P., van der Bevenkamp W. et al.* - Dev.Comp.Immunol. 1998. V. 12. P. 509-520.
2. *Romas-Vasconcelos G. R., Hermes-Lima M.* - J. Exp. Biol. 2003. V. 206. P. 675-685.
3. *Hermes-Lima M., Storeey K. B.* - Am.J.Physiol. 1995. V. 268. P. R1368-R1393.
4. *Grankvist K.* - Nature. 1981. V. 294. P. 158-162.
5. *Gandy S. E.* - J. Clin.Invest. 1982. V. 70. P. 658-659.
6. *Симонян М. А., Геворкян Д. Н., Мхитарян В. Г.* - Бюлл. эксп. биол. мед. 1987. Т. 103 С. 306-308.
7. *Симонян М. А.* Открытия. Изобрет. (СССР). 1988. 28. С. 107.
8. *Овакимян С. С., Арутюнова Л. Д., Качворян Э. А., Карагезян К. Г.* - ДНАН Армении. 2005. Т. 105. С. 288-294.
9. *Симонян М. А., Бабаян М. А., Симонян Г. М.* - Биохимия. 1995. Т. 60. С. 1977-1987.
10. *Симонян М. А., Карапетян А. В., Бабаян М. А., Симонян Р. М.* - Биохимия. 1996. Т. 61. С. 932-938.
11. *Симонян М. А., Симонян Г. М.* - Лицензия изобрет. № 341 Армпатента. Ереван. 1997.
12. *Симонян М. А., Симонян Г. М., Симонян Р. М.* - Лицензия изобрет. № 908 Армпатента. Ереван. 2001.
13. *Nishikimi M., Rao N., Jagi K.* - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1972. V. 62. P. 849-856.
14. *Симонян Р. М., Симонян Г. М., Симонян М. А.* - Мед. наука Армении. 2004. Т. 44. N1. С. 43-46.
15. *Симонян Г. М., Григорян Г. Г., Симонян Р. М., Симонян М. А.* В кн.: Актуальные вопросы военной медицины. Гос.мед.унт. Ереван. 1999. С. 48-51.
16. *Варданыан А. Р., Геворкян Д. Н., Агаджанов М. И., Симонян М. А.* - Мед. наука Армении. 1999. Т. 39. N2. С. 38-42.
17. *Варданыан А. Р., Геворкян Д. Н., Агаджанов М. И., Симонян М. А.* - Мед. наука Армении. 2000. Т. 40. N1. С. 20-22.
18. *Овакимян С. С., Арутюнова Л. Д., Качворян Э. А., Карагезян К. Г.* - ДНАН Армении. 2005. Т. 105. N3. С.288-294.

Հ. Ռ. Վարդանյան, Գ. Մ. Միմոնյան, ակադեմիկոս Կ. Գ. Ղարազյուզյան, Մ. Ա. Միմոնյան

Բուստանային *Hellix* խիտունջի սպիտակուցային գեղձից ստացված հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ ֆրակցիայի ադրեցությունը առնետի արյան մետաղապրոտեինների էնդոգեն մակարդակի վրա ալոքսանային դիաբետի ժամանակ

Մեր կողմից մշակված մեթոդով բուստանային *Hellix* խիտունջի սպիտակուցային գեղձից ստացվում է հակաօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված ֆրակցիա (ՀԱՖ)՝ գեղձի հոմոգենատի վերնստվածքային հեղուկի իոնափոխանակային արտրեացման միջոցով:

Ալոքսանով հարուցված դիաբետի ժամանակ ՀԱՖ-ի (1-ական մլ) 7-անգամյա ներորովայնային ներարկումը յուրաքանչյուր երեք օրը մեկ, հիմնականում չի հանգեցնում առնետների արյան հակա- և պրոօքսիդանտային ակտիվությամբ օժտված մետաղապրոտեինների (ՄՊ) էնդոգեն մակարդակի կարգավորման: Այնուհանդերձ 12 օրվա ընդհատումից և հետագա, նույն պայմաններում, 4-անգամյա ներարկումից հետո ՀԱՖ-ը հանգեցնում է ՄՊ էնդոգեն մակարդակի որոշակի մոտեցման ստուգիչ չափանիշներին՝ թուլացնելով օրգանիզմի սթրեսային վիճակը:

H. R. Vardanyan, G. M. Simonyan, academician K. G. Karageuzyan, M. A. Simonyan

The Preparation of Antioxidative Activity Fraction from Garden Mollusk *Hellix* Protein-gland and its Influence on the Endogenous level of rat Blood Metalloproteins at Alloxan-induced Diabetes

By the our elaborated method we have prepared an antioxidative activity fraction (AFF) from garden-mollusk *Helix*, using ion-exchanging chromatography of the glands' homogenate supernatant.

The intraperitoneal AFF injection (1 ml) to the alloxan -induced rats (7 times every 3-d day) does not cause the regulation of the endogenous level of anti- and prooxidative activity metalloproteins (MP). However, after a 12 day' break, the resumption of the AFF injection (4 times every 3-d days) on the whole brings these level of MP to the control data, decreasing the stressor state of the organisms.